

乳化型加工油の変敗を防止する微生物製剤の開発

矢野未右紀*¹、石川健一*¹、市毛将司*¹、石原那美*²、森昭博*¹、加納廣和*³

Preparation of Microbial Preservatives which Prevent Deterioration of Emulsified Mold Lubricant

Miyuki YANO*¹, Kenichi ISHIKAWA*¹, Masashi ICHIGE*¹,
Nami ISHIHARA*², Akihiro MORI*¹ and Hirokazu KANO*³

Food Research Center, AITEC*^{1*2*3}

乳化型加工油の一種であるアルミダイカスト用離型剤の変敗抑制手段として、有機酸等の天然の抗菌性物質を生産する微生物を添加する際に、取扱いやすさや保存等の利便性の観点から、微生物製剤とすることが望ましい。そこで、微生物製剤の調製法、保存法等について検討し、微生物製剤の開発を目指した。

微生物製剤の調製法として凍結乾燥法を用い、凍結乾燥障害防止剤（分散剤）として各種糖類及びアミノ酸等を使用したときの凍結乾燥菌体の生残率を比較した。また、微生物製剤の保存温度と保存期間の関係の検討を行った。

1. はじめに

工業用油剤、中でも乳化型加工油は金属加工分野において不可欠なものであり、火災防止や資源、環境等の観点からは有用なものである。これらは水で希釈して使用されるため、乳化型加工油中において細菌が繁殖し、微生物の代謝産物が悪臭源となり作業環境を悪化させることが問題となっている。また、バイオフィルムの生成により装置の異常動作を引き起こして本来の製品性能が発揮できなくなるといった状況がある。

現在は微生物の繁殖を抑えるために種々の化学合成防腐剤を製品に添加しているが、これらの防腐剤を使用し続けることにより耐性菌が出現しつつある。そのため、従来の防腐剤とは異なる、新規の簡便な方法による微生物変敗抑制対策が強く望まれている。

そこで、変敗原因菌の生育の阻止、作業環境の改善及びコストの削減を図ることを目的として、変敗原因菌の増殖を抑制する有機酸等の天然の抗菌性物質を生産する微生物を用いる上で、取扱いやすさや保存等の利便性に優れた微生物製剤の開発を行った。

2. 実験方法

2.1 供試菌及び使用培地

乳化型アルミダイカスト用離型剤の変敗液より分離した変敗原因菌の増殖を抑制するため、食品工業技術センター保有の微生物菌株の中から選択した防腐剤耐性で有

機酸等の抗菌性物質を生産する乳酸菌を用いた。乳酸菌は、MRS 培地を使用して、30℃、18 時間培養した。

2.2 微生物菌数の測定方法

乳酸菌数は、MRS 寒天培地を用いて、塗抹法により 30℃で 48 時間培養後、出現したコロニー数を計測した。

2.3 凍結乾燥法による微生物製剤の調製^{1~3)}

30℃にて 18 時間培養した乳酸菌の培養液を MRS 培地 50ml の入ったねじ口試験瓶に 2%接種し、30℃にて 18 時間培養した（本培養液）。培養後、ねじ口試験管に 5ml ずつ分注し、3,000rpm で 10 分間遠心分離を行った。デカンテーションにより上澄液を除去し、沈殿した菌体に滅菌水 5ml を添加して菌体を分散させ、再び同一条件で遠心分離を行った。この洗浄操作を計 2 回行った後、上澄液を除去した菌体に凍結乾燥障害防止剤を溶解させた溶液各 5ml を加えて菌体を分散させ、再度同一条件で遠心分離を行った。デカンテーションにより上澄液を除去した後、残液と菌体とを懸濁し、-80℃で凍結した。凍結した菌体の入った試験管のねじを緩めて凍結乾燥機装置内に並べた後、真空凍結乾燥に供した。

2.4 生残率の算出

凍結乾燥菌体の生残率は、以下のようにして求めた。

2.3 での本培養液の細菌数 (cfu/ml) を測定した（凍結乾燥前）。凍結乾燥後の細菌数 (cfu/ml) は凍結乾燥菌体の入った試験管に分量と等量の MRS 培地を加えて懸濁したものについて測定を行った。

*1 食品工業技術センター 保蔵技術室（現保蔵包装技術室）
*3 食品工業技術センター 保蔵技術室（現産業労働部

*2 食品工業技術センター 保蔵技術室（現分析加工技術
地域産業課）

以上の値を用いて、生残率は、「生残率 (%) = [凍結乾燥後細菌数 (cfu/ml)] / [凍結乾燥前細菌数 (cfu/ml)] × 100」の式により算出した。

2.5 凍結乾燥時の凍結乾燥障害防止剤（分散剤）の検討

凍結乾燥障害防止剤としてグルコースをはじめとする糖類及びグルタミン酸ナトリウム等を用いて、物質の種類や濃度の違いによる生残率の変化を比較した。また、グルコース及びグルタミン酸ナトリウムを併用した場合の生残率についても検討した。なお、併用の際には、アミノカルボニル反応を防止するため、別々に滅菌した溶液を用意し、混合して使用した。

2.6 微生物製剤の保存法についての検討

調製した微生物製剤（凍結乾燥菌体）の有効菌体数に対する保存温度や保存期間による影響を調べるため、25℃、5℃、-20℃、-80℃の各保存温度における菌数の経時変化を測定した。

3. 実験結果及び考察

3.1 微生物製剤の調製法についての検討

凍結乾燥の際に使用する凍結乾燥障害防止剤(分散剤)は、一般に血清、脱脂乳などが用いられるが、離型剤に添加することを考え、組成の明らかな物質を用いることとした。

3.1.1 凍結乾燥障害防止剤としてグルコースを用いた時の濃度の違いによる生残率の変化

代表的な凍結乾燥障害防止剤であるグルコースについて、濃度と生残率の変化を調べた。その結果を図1に示す。グルコースを添加していないもの(対照)の生残率に大きなばらつきが見られた。グルコースを添加したものについても生残率は有意に変動した。グルコース濃度2.5~15%で他の濃度と比較して生残率が高かった。

生残率がばらつく原因の可能性としては、凍結乾燥時の乾燥温度と乾燥後の温度の影響が考えられる。ばらつきを抑える対策としては、乾燥温度のより厳密な制御と、凍結乾燥終了後直ちに低温保存することが挙げられる。

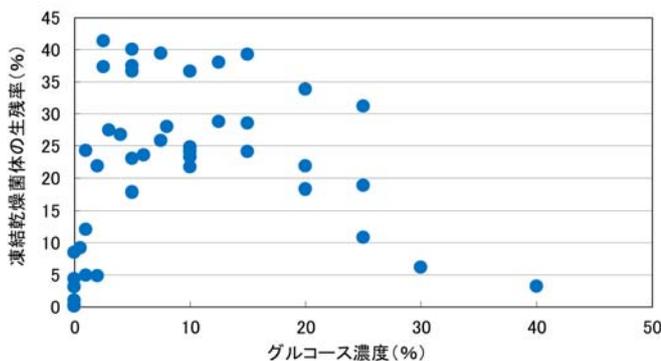


図1 グルコース濃度と生残率の変化

3.1.2 凍結乾燥障害防止剤として各種糖類を用いた時の生残率の違い

単糖類であるグルコース(ブドウ糖)、フルクトース(果糖)、ガラクトース、マンノース及び二糖類であるスクロース(ショ糖)、マルトース(麦芽糖)、ラクトース(乳糖)、トレハロースについて、各々5%及び10%溶液に菌体を懸濁して凍結乾燥を行い、その生残率を比較した。その結果を図2に示す。生残率は、単糖類では濃度5%より10%の方が高く、二糖類ではラクトースを除いて5%の方が10%より高かった。また、単糖類では5%、10%共に、生残率はマンノース>ガラクトース>グルコース>フルクトースの順に高かった。

グルコース、キシロース、三糖類のラフィノース及び糖アルコールであるソルビトール、キシリトール、エリスリトール、マンニトール、さらに分散剤として一般的な脱脂乳について、各々10%溶液に菌体を懸濁して凍結乾燥を行い、生残率を求めた。凍結乾燥障害防止剤がグルコースのときの凍結乾燥後の生残率を100として比較した結果を図3に示す。ラフィノースは比較的良い効果があるが、キシロース及び糖アルコールは単独では凍結乾燥障害防止剤としては適さないと考えられた。

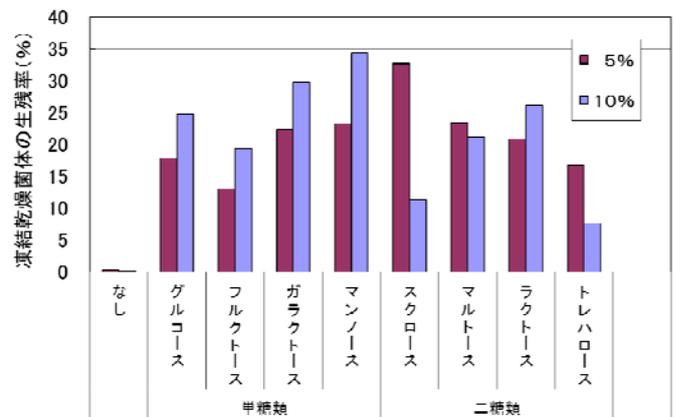


図2 各種糖類を用いた時の生残率

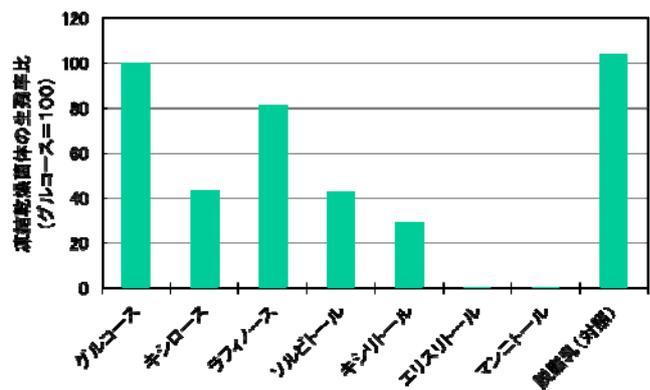


図3 各種糖類(10%)を用いた時の生残率

3.1.3 凍結乾燥障害防止剤としてグルタミン酸ナトリウムを用いた時の生残率の変化

凍結乾燥障害防止剤として使われることの多いグルタミン酸ナトリウムについて、濃度の違いによる生残率の変化を調べた。その結果を図4に示す。グルタミン酸ナトリウムを添加していないもの（対照）の生残率にばらつきが見られた。凍結乾燥障害防止剤としてグルタミン酸ナトリウム濃度は約5%が適当であった。

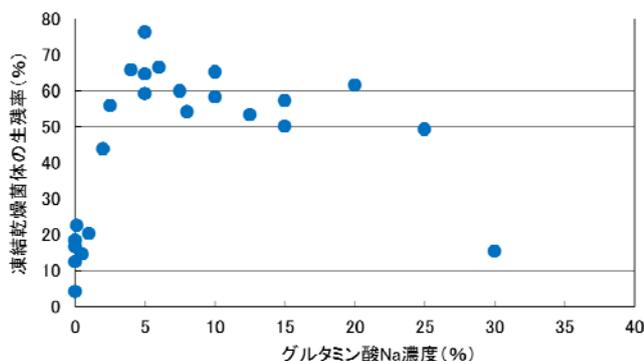


図4 グルタミン酸ナトリウム濃度と生残率の変化

3.1.4 凍結乾燥障害防止剤としてグルコース及びグルタミン酸ナトリウムを併用した場合の生残率

凍結乾燥障害防止剤の相乗効果を調べるため、一定量のグルタミン酸ナトリウム存在下においてグルコース濃度を変化させた場合と、一定量のグルコース存在下においてグルタミン酸ナトリウム濃度を変化させた場合の凍結乾燥菌体の生残率を比較検討した。

グルタミン酸ナトリウムの濃度を一定（5%）にしてグルコース濃度を変化させた時の生残率（図5-1）は、グルコース2.5%でグルタミン酸ナトリウム単独時より高く、その他の濃度では単独時とほぼ同じであった。

グルコースの濃度を一定（10%）にしてグルタミン酸ナトリウム濃度を変化させた時の生残率（図5-2）は、グルタミン酸ナトリウム5%でグルコース単独時より高く、10%では単独時よりむしろ低下した。

以上の結果から、グルコースとグルタミン酸ナトリウムを併用すれば、凍結乾燥障害防止剤として単独で使用するよりも有効であることが示唆された。

3.2 微生物製剤の保存法についての検討

調製した微生物製剤の生残率に対する保存温度及び保存期間による影響を調べるため、25℃、5℃、-20℃、-80℃で24週間保存した結果を図6に示す。

25℃保存のものは、4週後に菌数が1/10,000以下に減少し、その後約8週間程安定していたが、16週後に死滅した。

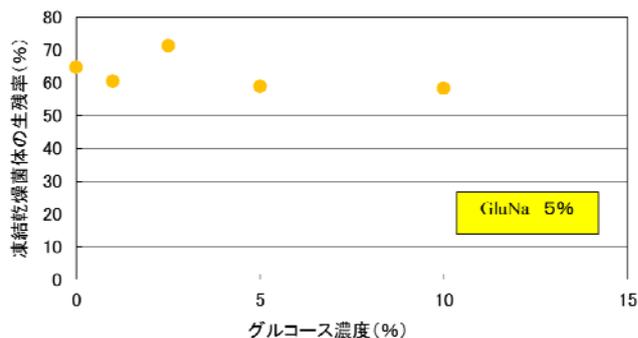


図5-1 グルタミン酸ナトリウムの濃度を一定（5%）にしてグルコース濃度を変化させた時の生残率

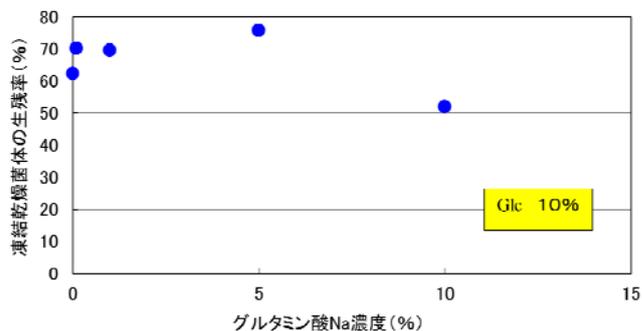


図5-2 グルコースの濃度を一定（10%）にしてグルタミン酸ナトリウム濃度を変化させた時の生残率

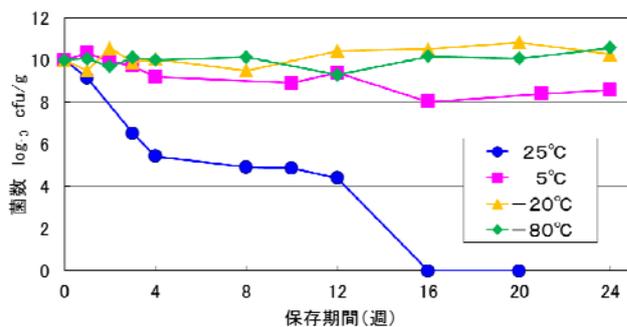


図6 保存温度の違いによる菌数の経時変化

5℃保存のものは、当初菌数が徐々に減少して、16週で1/100に減少したが、その後はほぼ一定であった。

-20℃及び-80℃保存のものは、保存期間を通じて菌数は凍結乾燥直後とほとんど変わらなかった。

以上の結果、微生物製剤の有効菌体数の保持の点から、0℃以下での保存が望ましいと考えられた。

4. 結び

微生物製剤の調製法として凍結乾燥障害防止剤（分散剤）に各種糖類やアミノ酸等を使用したときの凍結乾燥菌体の生残率を比較した。また、微生物製剤への保存温度と保存期間の影響を検討した。

今後、本研究で開発した微生物製剤の実用化に向けて

はいくつか課題が挙げられる。本研究では研究室レベルでの少量の試作であったが、工業的に大量に製造する場合には凍結速度が菌体の損傷や死滅に大きな影響を与えるため、凍結速度の調節が必要となる。本研究では乳酸菌の培養に MRS 培地を使用した。また、実用的にはより安価な培地を使用する必要がある。また、微生物製剤を添加することによる製品の性能への影響について詳細に検討することなどがある。

文献

- 1) 根井外喜男：微生物の保存法，P20(1977)，東京大学出版会
- 2) 根井外喜男：凍結・乾燥と保護物質，P78(1972)，東京大学出版会
- 3) 特許第 3504365 号「微生物保護剤及び該保護剤を用いた凍結又は凍結乾燥微生物の製造法」（登録日 2003.12.19)

*1 食品工業技術センター 保蔵技術室（現保蔵包装技術室） *2 食品工業技術センター 保蔵技術室（現分析加工技術室）
*3 食品工業技術センター 保蔵技術室（現産業労働部 地域産業課）